

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 01-134246

(43)Date of publication of application : 26.05.1989

(51)Int.Cl.

G01N 27/30

G01N 27/46

(21)Application number : 62-292326

(71)Applicant : MATSUSHITA ELECTRIC IND CO LTD

(22)Date of filing : 19.11.1987

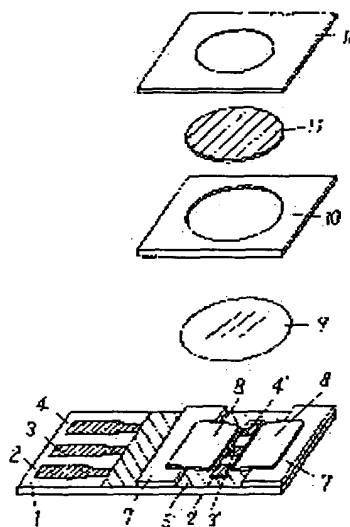
(72)Inventor : KAWAGURI MARIKO
FUJITA MAYUMI
NANKAI SHIRO
IJIMA TAKASHI
SUETSUGU SACHIKO
KOMATSU KIYOMI
MORIGAKI KENICHI
KOBAYASHI SHIGEO

(54) BIOSENSOR

(57)Abstract:

PURPOSE: To easily measure the substrate concentration in an organic body by integrating an insulating substrate, an electrode system, a porous body which carries oxidation reducing enzyme, a porous body film, and a porous body which carries an electron acceptor.

CONSTITUTION: The electrode system consisting of a counter electrode 2, a measuring electrode 2, and a reference electrode 4 is formed on the insulating substrate 1 and an insulating layer 5 is formed covering said part partially except electrochemical operating parts 2'W4'. Then a water-absorptive high polymer layer is provided on the surface of electrode systems 2'W4', a groove is formed on the electrode system with both-sided adhesive tapes 7, and tapes of cellulose carrying oxidation reducing enzyme are formed on both sides as guide layers 8. Then a polycarbonate porous material film 9 is adhered as the filter film on a holding frame 10 and fixed with the both-sided adhesive tapes 7 so that the electrode systems 2'W4' are covered. Further, the porous body 11 which carries the electron acceptor is placed at the hole part of the holding frame 10 and a resin-made cover 12 is adhered to integrate the entire body.



LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2000 Japan Patent Office

⑫ 公開特許公報(A) 平1-134246

⑮ Int.Cl.⁴

G 01 N 27/30
27/46

識別記号

庁内整理番号

J-7363-2G
M-7363-2G

⑯ 公開 平成1年(1989)5月26日

審査請求 未請求 発明の数 1 (全5頁)

⑭ 発明の名称 バイオセンサ

⑰ 特 願 昭62-292326

⑱ 出 願 昭62(1987)11月19日

⑲ 発 明 者	河 栗 真 理 子	大阪府門真市大字門真1006番地	松下電器産業株式会社内
⑲ 発 明 者	藤 田 真 由 美	大阪府門真市大字門真1006番地	松下電器産業株式会社内
⑲ 発 明 者	南 海 史 朗	大阪府門真市大字門真1006番地	松下電器産業株式会社内
⑲ 発 明 者	飯 島 孝 志	大阪府門真市大字門真1006番地	松下電器産業株式会社内
⑲ 発 明 者	末 次 佐 知 子	大阪府門真市大字門真1006番地	松下電器産業株式会社内
⑲ 発 明 者	小 松 き よ み	大阪府門真市大字門真1006番地	松下電器産業株式会社内
⑲ 発 明 者	森 垣 健 一	大阪府門真市大字門真1006番地	松下電器産業株式会社内
⑲ 発 明 者	小 林 茂 雄	大阪府門真市大字門真1006番地	松下電器産業株式会社内
⑳ 出 願 人	松下電器産業株式会社	大阪府門真市大字門真1006番地	
㉑ 代 理 人	弁理士 中尾 敏男	外 1 名	

明 細 書

1、発明の名称

バイオセンサ

2、特許請求の範囲

- (1) 少なくとも測定極と対極からなる電極系を設けた絶縁性基板を備え、酵素と電子受容体と試料液の反応に際しての基質濃度を測定するバイオセンサにおいて、前記電極系の表面に吸水性高分子層を設け、電極系を前後からはさんだ位置に酸化還元酵素を担持した誘導層を設け、電極を覆う様に透過膜を置き、さらにその上に電子受容体を担持した多孔体を配し、前記各要素を一体化したことを特徴とするバイオセンサ。
- (2) 吸水性高分子が、カルボキシメチルセルロース系、ゼラチン系、アクリル酸系、ビニルアルコール系、ビニルピロリドン系、無水マレイン酸系からなる群のいずれかもしくはそれらの混合物である特許請求の範囲第1項記載のバイオセンサ。

3、発明の詳細な説明

産業上の利用分野

本発明は、種々の微量の生体試料中の特定成分について、試料液を希釈することなく迅速かつ簡易に定量することのできるバイオセンサに関する。

従来の技術

従来、血液などの生体試料中の特定成分について、試料液の希釈や攪拌などの操作を行なうことなく高精度に定量する方式としては、第5図に示す様なバイオセンサを提案してきた。(例えば特開昭61-294351号公報)

このバイオセンサは、絶縁性の基板1に、スクリーン印刷により導電性カーボンペーストを印刷し加熱乾燥することにより、対極2、測定極3、参照極4からなる電極系を形成する。次に、電極系を部分的に覆い、各々の電極の電気化学的に作用する部分となる2'、3'、4'を残す様に絶縁性ペーストを前記同様印刷し、加熱処理して絶縁層5を形成する。次に、穴をあけた樹脂製の保持枠9を絶縁層5に接着し、前記電極系2'、3'、4'を覆う様に多孔体10を穴の中に保持し、さらに多孔

体より小さい径の開孔部を有する樹脂製カバー11を接着し、全体を一体化する。上記多孔体には、酸化還元酵素と電子受容体が担持されており、基質を含む試料液を多孔体に添加すると、酵素反応が進行し、電子受容体が還元される。酵素反応が終了した後、この還元された電子受容体を前記電極で電気化学的に酸化し、この時得られる酸化電流値から試料液中の基質濃度を求める。

発明が解決しようとする問題点

この様な従来の構成では、尿や血清の様な低粘度のサンプルでは微量を添加するだけで基質濃度が精度よく短時間で測定できるが、全血のように、血球が混在すると、電極表面に血球が付着して応答が大きく低下し、さらに高粘度のため、酵素反応が遅く、5分以上反応終了までに時間がかかり測定値がばらついた。さらに、酸化還元酵素および電子受容体と同じ多孔体に担持すると、湿度や光の影響により初期特性を維持できない場合があった。

本発明は、これらの点について種々検討した結

本発明によれば、電極系をも含めたディスプレイタイプのバイオセンサを構成することができ、試料液を多孔体に添加することにより、極めて容易に基質濃度を測定することができる。

しかも、酵素と電子受容体を分離して担持することにより作成時および保存において、光や湿度の影響を受けず、長期安定な応答が得られるようになった。さらに、電極系をはさむように誘導層を設置しているため、透過膜を透過した試料液が確実に電極系上に誘導され、酵素反応が行なわれるようになった。電極系上の吸水性高分子によりぬれ性が向上され、試料中の蛋白質の吸着を防ぐことにより、精度のよい測定が可能となった。さらに、透過膜を透過した低粘度の試料液のみが酵素と反応するため、短時間で反応が終了し、しかも酵素の担持量も微量で足りることができる。

実施例

以下、本発明の一実施例について説明する。

バイオセンサの一例として、グルコースセンサについて説明する。第1図は、グルコースセンサ

果、透過膜および電極系の表面に吸水性高分子層を設けて、多孔体と一体化し、さらに、透過膜の下に誘導層を設けこれに酸化還元酵素を担持させることで、多孔体中の電子受容体と分離して担持し生体試料中の特定成分を極めて容易に迅速かつ高精度に定量ができるディスプレイタイプで長期保存可能なバイオセンサを提供するものである。

問題点を解決するための手段

本発明は上記問題点を解決するため、絶縁性基板に少なくとも測定極と対極からなる電極系を設け、酵素と電子受容体と試料液の反応に際しての物質濃度変化を電気化学的に前記電極系で検知し、試料液中の基質濃度を測定するバイオセンサにおいて、前記電極系の表面に吸水性高分子層を設け、電極を前後からはさむ様に酸化還元酵素を担持した誘導層を配し、電極を覆う様に透過膜を、さらにその上に電子受容体を担持した多孔体を配し、各要素を一体化したものである。

作用

の一実施例について示したもので、構成部分の分解図である。ポリエチレンテレフタレートからなる絶縁性基板1に、スクリーン印刷により導電性カーボンペーストを印刷し、加熱乾燥することにより、対極2，測定極3，参照極4からなる電極系を形成する。次に、この電極系を部分的に覆い、各々の電極の電気化学的に作用する部分となる2'，3'，4'（各1mm）を残す様に、絶縁性ペーストを前記同様印刷し、加熱処理して絶縁層5を形成する。

この電極系（2'，3'，4'）の表面をセルロース性の吸水性高分子の1種であるCMC6（カルボキシメチルセルロース）の0.5%水溶液を塗布し45℃で30分乾燥した。

次に、第1図に示すように両面接着テープ7で電極系上に溝を作り、両側に電極を前後からはさむ様に誘導層8としてセルロースのテープを設置する。このセルロースのテープには、酸化還元酵素としてグルコースオキシダーゼ10mg/lをリン酸緩衝液（PBS,6）に溶かした液を含浸させた後、

乾燥している。次に、穴をあけた樹脂製の保持枠10に透過膜として孔径 $1\mu\text{m}$ のポリカーボネート多孔体膜9を接着し、前記電極系2', 3', 4'を覆う様に両面接着テープ7で固定する。さらに、保持枠10の開孔部に多孔体11を置き、多孔体より小さい径の開孔部を有する樹脂製カバー12を接着して全体を一体化する。多孔体11はナイロン不織布に電子受容体としてフェリシアン化カリウムを $\text{pH}5.8$ のリン酸緩衝液に溶解した液を含浸後、減圧乾燥して作製したものである。この一体化されたバイオセンサについて、測定極3に沿った断面図を第2図に示す。

上記の様に構成したグルコースセンサの多孔体へ試料液としてグルコース標準液を滴下し、2分後に参照極4'を基準にして測定極3'の電位をアノード方向へ $+0.5\text{V}$ パルス電圧を印加し、6秒後の電流を測定する。この場合、添加されたグルコース標準液により多孔体に担持されたフェリシアン化カリウムが溶解する。ポリカーボネート多孔体膜を通過した後、電極系を前後からはさむよう

るので粘度が低下し、すみやかに酵素反応を行なうことができた。さらに、ポリカーボネート多孔体膜上の液を電極上へ供給するため誘導層として電極をはさむように設置されたセルロースのテープにより、迅速に効率よく透過液を誘導することができ、血液を滴下後30秒で電極系上に反応液を供給することができた。セルロースのテープがない場合は、反応液が電極系に達するまでにかかった。溝の高さを低くすると、反応液は早く達するが、溝が $100\mu\text{m}$ より低くなると気泡が残ったり、応答電流がポリカーボネート多孔体膜の影響をうけてばらつくという現象がみられた。セルロースのテープを電極上にかかる様に置くと、反応液はすみやかに電極上に達するが、気泡が発生する場面が見られ、応答も低目にばらついた。セルロースのテープは、電極上にかからない様に、しかも接近した所に設置すれば、反応液は有効にすみやかに電極上に供給され、安定な応答が得られることが判明した。セルロースの他にもレーヨン、バルブなど親水性の薄い多孔体が使用できた。

に置かれたセルローステープに誘導されて電極系上へ液が達する。その際、セルロースのテープ上に担持されたグルコースオキシダーゼが溶け出てグルコースを酸化し、フェリシアン化カリウムが同時に還元されてフェロシアン化カリウムが生成する。そこで、上記のパルス電圧の印加により、生成したフェロシアン化カリウムの濃度に基づく酸化電流が得られ、これは基質であるグルコース濃度に対応する。酸化電流はグルコース濃度が 700mg/dl まで良好な直線性が得られた。

上記のグルコースセンサに血液サンプル $20\mu\text{l}$ を滴下して2分後の応答電流を測定すると、非常に再現性の良い応答が得られた。血液の場合は血球が混在しているため粘度が高く、酵素反応をすみやかに行なわせるのは非常に難しく、従来では遠心分離や攪拌するという操作が不可欠であった。又電極表面に蛋白質が付着して応答がばらつく現象がみられた。しかし、孔径 $1\mu\text{m}$ のポリカーボネート多孔体膜を透過膜として用いると、血球が透過されその後グルコースオキシダーゼと反応す

ナイロン不織布からなる多孔体11に、グルコースオキシダーゼとフェリシアン化カリウムを担持しても測定は可能であるが、作成および保存の際、グルコースオキシダーゼとフェリシアン化カリウムが湿度や光の影響で反応することがわかったので、別々に担持した方が簡易に作成でき、長期保存にも有効と考えられる。さらに、透過された液量は、滴下された液の約 $1/2 \sim 1/3$ となるので、酵素の担持量も微量でよくなった。

電極表面にCMCを塗布することにより、電極のぬれ性がよくなり、わずか $2 \sim 3\mu\text{l}$ の反応液でも充分電極系上を覆うことができた。又、反応液中の蛋白質等が電極表面へ付着するのを阻止し、再現性の良い応答が得られた。吸水性高分子としてはカルボキシメチルセルロース系、ゼラチン系、アクリル酸塩系、ビニルアルコール系、ビニルピロリドン系、無水マレイン酸系のものが好ましい。

本発明のバイオセンサにおける一体化の方法としては実施例に示した枠体、カバーなどの形や組み合わせに限定されるものではない。又、酸化還

元酵素と電子受容体の組み合わせも前記実施例に限定されることはなく、本発明の主旨に合致するものであれば用いることができる。一方、上記実施例においては、電極系として3電極方式の場合について述べたが、対極と測定極からなる2電極方式でも測定は可能である。

発明の効果

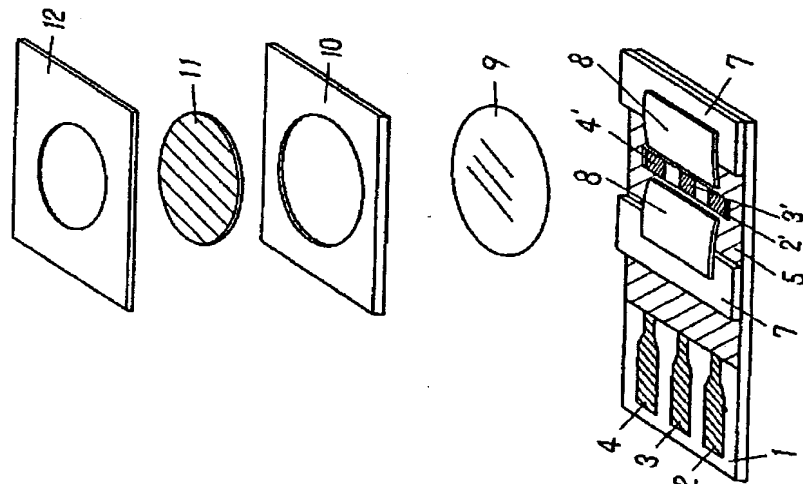
このように本発明のバイオセンサは、絶縁性基板、電極系、酸化還元酵素を担持した多孔体、多孔体膜および電子受容体を担持した多孔体を一体化することにより、極めて容易に生体試料中の基質濃度を測定することができ、酵素と電子受容体を多孔体膜を介して担持することにより、迅速に測定し長期保存を可能にした。さらに、電極表面に吸水性高分子を塗布し妨害物質の電極への吸着を防ぎ、測定精度を高めた。

4、図面の簡単な説明

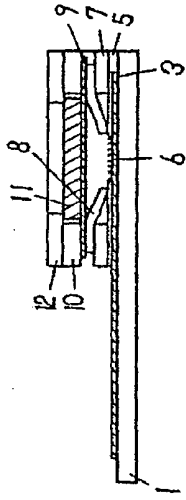
第1図は本発明の一実施例であるバイオセンサの分解斜視図、第2図はその縦断面図、第3図は従来のバイオセンサの分解斜視図である。

層膜被膜
導通孔穴
誘導層多孔
………
8 9 10 11 12
板
基
性 塩 酸 性
誘 導 層
絶 縁 層
対 対 参 差 面
………
1 2 3 4 5 7

第1図



第 2 圖 6 --- CMC



第 3 圖

